

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-333025

(43)Date of publication of application : 17.12.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/50  
G07K 15/06  
G01N 33/53  
G01N 33/68

(21)Application number : 04-136731

(71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 28.05.1992

(72)Inventor : SAITO KOICHI  
UWAKAWA MASARU  
KANEKO HIDEO  
YOSHITAKE AKIRA

## (54) EARLY DIAGNOSIS MARKER FOR ALPHA2U -GLOBULIN NEPHROPATHY

## (57)Abstract:

PURPOSE: To perform early diagnosis and to make it possible to detect chemical material, which induces  $\alpha$  2u-globulin nephropathy by using the kidney-type  $\alpha$  2u- globulin, which is present in the urine of male rat, as a marker.

CONSTITUTION: Antiserum is prepared by growing  $\alpha$  2u-globulin from the urine of a male rat and performing subcutaneous administration into a rabbit. Chemical material, which induces the deterioration of a kidney function, is administered into a male rat. An SDS-polyacrylamide gel electrophoresis method is performed. The fluctuation of the  $\alpha$  2u-globulin in the kidney, serum and urine is studied with staining. Antiserum is used, and the  $\alpha$  2u-globulin is confirmed by a western blotting technique. As a result, the increase in the protein band of the molecular weight of about 16KDa is recognized in the chemical-material administration group in the protein in the kidney and the urine. It is found that the protein is the kidney type  $\alpha$  2u-globulin by the western blotting technique. The  $\alpha$  2u-globulin in the serum is recognized in one of the ordinary-type proteins by the western blotting technique. However, the large change is not found in the chemical-material administration group.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-333025

(43)公開日 平成5年(1993)12月17日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50	T	7055-2 J		
C 0 7 K 15/06		8619-4 H		
G 0 1 N 33/53	D	8310-2 J		
33/68		7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数2(全 3 頁)

(21)出願番号 特願平4-136731

(22)出願日 平成4年(1992)5月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 1991年11月28日 E  
 levier Scientific Publish  
 er Ireland Ltd. 発行の「TOXICO  
 LOGY 第70巻 第2号」に発表

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社  
 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 斉藤 幸一

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住  
 友化学工業株式会社内

(72)発明者 宇和川 賢

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住  
 友化学工業株式会社内

(72)発明者 金子 秀雄

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住  
 友化学工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 諸石 光▲ひろ▼ (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】  $\alpha 2u$  - グロブリン腎症の早期診断マーカー

(57)【要約】

【構成】化学物質により雄性ラットに誘発される  $\alpha 2u$  -  
 グロブリン腎症の早期診断マーカー及びおよびそのマ  
 ーカーを利用した  $\alpha 2u$  - グロブリン腎症を誘発させる化学  
 物質の早期スクリーニング法

【効果】本発明で得られた知見を利用することによりSD  
 S-PAGEや抗体を用いたラジオイムノアッセイ(RIA) 等を  
 用いて従来のようにラットを屠殺し、免疫組織染色を行  
 うことなく、早期に診断し、 $\alpha 2u$  - グロブリン腎症を誘  
 発する化学物質を簡便に知ることが出来る。これによ  
 り、農薬、医薬品等化学物質の早期開発、毒性メカニズ  
 ムの利用に役立てることが可能となった。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症の診断マーカーとしての腎臓型  $\alpha_{2u}$ -グロブリン

【請求項2】 尿中に存在する腎臓型  $\alpha_{2u}$ -グロブリンを用いた  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症診断法

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、化学物質により雄性ラットに誘発される  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症の早期診断マーカー及びおよびそのマーカーを利用した  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症を誘発させる化学物質の早期スクリーニング法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】雄性ラットが肝臓で産生する  $\alpha_{2u}$ -グロブリン(通常型:分子量19000)は通常は血中に分泌後尿中に排泄されるが、一部は腎臓中に再吸収され、腎臓型(分子量16000)に変換された後蛋白分解酵素によりリソゾーム内で加水分解される。しかし、ある種の化学物質はこの腎臓中での  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの分解に影響を及ぼし、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンの蓄積を誘発し  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症を発症させることが知られている。また、この  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症はラット腎癌の発現を上昇させる事が知られている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来はこの  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの蓄積は化学物質を投与後、ラットを屠殺し腎臓の組織切片を作製し  $\alpha_{2u}$ -グロブリン抗体を用いた免疫組織染色を行った後、病理組織学的に観察しなければならなかった。このことから、化学物質の安全性を早期に知る上で、ラットを屠殺することなく、早期に且つ簡便に  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症の診断及び  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症誘発物質を知るマーカーが必要とされている。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症を簡便に知るマーカーを見出すことを目的として、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症誘発物質を投与し、腎、血清、血中の蛋白の挙動をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)で検討し、鋭意努力を行った。その結果、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症のラットの尿中に腎臓型  $\alpha_{2u}$ -グロブリンが増加することを見出した。

## 【0005】

【発明の効果】本発明で得られた知見を利用することによりSDS-PAGEや抗体を用いたラジオイムノアッセイ(RIA)等を用いて従来のようにラットを屠殺し、免疫組織染色を行うことなく、早期に診断し、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症を誘発する化学物質を簡便に知ることが出来る。これにより、農薬、医薬品等化学物質の早期開発、毒性メカニズムの利用に役立てることが可能となった。

【0006】以下、本発明を詳細に説明する。成熟雄ラ

ットには、特有の低分子量の蛋白質である  $\alpha_{2u}$ -グロブリンが存在する。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンは肝臓で産生され血中に分泌される。この分泌量は、90~180  $\mu\text{g/g}$  肝臓/時間といわれている。この肝臓での産生はアンドロジェン(男性ホルモン)が必要であり、その他成長ホルモン、グルココルチコイド、甲状腺ホルモン等でも影響を受ける。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンは分子量18700 であるため糸球体で濾過され(50 ~60mg/日)その40%は尿中に排泄され、60%は肝臓で再吸収される。成熟雌ラットでは雄の1%以下しか尿中に排泄されない。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンは通常162 アミノ酸で構成されるが、腎臓中で再吸収される時にプロセッシングを受け、11アミノ酸残基分短い形となって、腎臓中で存在する。腎臓中ではほとんどリソゾーム中に認められる。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンの生体内での役割はよくわかっていないが、親油性の高い化学物質との結合性を有する点から何らかの輸送蛋白として機能していると考えられている。

【0007】成熟雄ラットにある種の化学物質(d-リノネン:柑橘類の皮等に含まれる天然物、2,4,4-トリメチルペンタン(無鉛ガソリンに含まれる化学物質、1,4-ジクロロベンゼン:殺虫剤等)を継続投与したとき腎臓の近位尿細管に硝子滴と呼ばれる沈着物質が認められる。この硝子滴が異常に沈着した近位尿細管上皮細胞は変性、壊死脱落、再生を繰り返す。また、脱落細胞が尿細管に詰まり腎臓細胞が誘発される。さらに長期投与した場合石灰質の沈着、上皮細胞の異常増殖がおき腎機能が低下する。この状態がさらに1年異常継続されるとやがて腎癌が生じる。硝子滴の原因物質は蛋白質であることが多いが、この原因物質が  $\alpha_{2u}$ -グロブリンである場合これを  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症と呼ぶ。この  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症は、ラット腎癌の発現を上昇させることが知られている。

【0008】長期毒性試験は慢性毒性試験と発癌性試験の2つに分けられる。農薬、家庭防除薬等を登録申請する場合、米国EPAや厚生省等のガイドラインによって試験系は異なるが、通常ラットにおいては2年間、約500匹(雄、雌それぞれ主投薬群50匹+予備群10匹程度で最低4主の投与量群が必要)以上の動物を使用した試験が要求され、莫大な人力と期間を要する。この長期毒性試験の発癌性試験において、ラット腎癌の発現を検討する必要がある。しかし、ラット腎癌の前段階である  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症に関して、従来は化学物質を投与したラットを屠殺し、腎臓の組織切片を作製し、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン抗体を用いた免疫組織染色を行った後、病理組織学的に観察する方法しかなかった。長期毒性試験は、前述のようにラットにおいては2年間、約500匹異常の動物を使用する試験になるために、それぞれを屠殺し、さらにそれぞれを観察することは莫大に人力を必要とする。そこで本発明者らは、簡便・迅速は  $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症のスクリーニング方法を開発すべく、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン

ン腎症のラットの尿中に腎臓型  $\alpha_{2u}$  - グロブリンが増加することを見出した。本発明で得られた知見を利用することによりラットの尿中に存在する腎臓型  $\alpha_{2u}$  - グロブリンをマーカーとすることにより、従来のようにラットを屠殺し、免疫組織染色を行うことなく、早期に診断し、 $\alpha_{2u}$  - グロブリン腎症を誘発する化学物質を簡便に知ることが可能となった。

#### 【0009】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明する。本発明は、以下の実施例にのみ限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更をすることが出来ることは言うまでもない。

##### 実施例1. 実験動物

$\alpha_{2u}$  - グロブリン腎症モデル作製のため、d-リモネン(和光純薬)を60mg/mlコーンオイルの濃度に調製し300mg/kg体重の割合で1日1回、14日連続、4匹の12週齢のSD系ラット(日本チャールスリバー)に経口投与した。対象群4匹には5ml/kg体重の割合でコーンオイルを同様に投与した。最終(14回目)投与後、ラットはすべてガラス製代謝ケージに移し、尿を個別に採取し、24時間ごとにエーテル麻酔加水分解で全採血による致死後、腎臓を摘出した。左右の腎臓はそれぞれ縦割りに2つに分け、一部は病理組織学的に使用した。残りの腎臓は氷冷した。0.01M ナトリウムリン酸緩衝液(pH7.2)でホモジナイズし遠心分離後(105000g, 60分)、腎臓可溶性画分を分取した。尿および腎臓可溶性画分の蛋白含量キット(バイオラッド)を用いた。

#### 【0010】実施例2. 病理組織学的観察

腎臓は10% 中性ホルマリン緩衝液による固定の後、パラフィン包埋し5  $\mu$ m の切片を作製した。この切片はヘマ

トキシリン-エオジン染色し光学顕微鏡により病理像を観察した。この結果、明らかにd-リモネン投与により腎臓の近位尿細管に  $\alpha_{2u}$  - グロブリン腎症に特有な硝子滴の以上沈着が認められた。

#### 【0011】実施例3. $\alpha_{2u}$ - グロブリンに対する抗体の作製

$\alpha_{2u}$  - グロブリンを硫酸分画、CM-52陽イオン交換カラム、HPLC-ゲル濾過カラム(TSK gel3000XL、東ソー)を用いて、ラット尿より生成した。精製蛋白質のアミノ酸配列一致により  $\alpha_{2u}$  - グロブリンの確認後、ウサギに皮下投与し抗血清を得た。

#### 【0012】実施例4. 腎臓、血清、尿中 $\alpha_{2u}$ - グロブリンの変動

18% ゲル濃度でSDS-PAGEを行いクマジーブリリアントブルーによる染色にて、腎臓、血清、尿中  $\alpha_{2u}$  - グロブリンの変動を検討した。また、上記抗血清を用いて  $\alpha_{2u}$  - グロブリンをウェスタンブロッティング法により確認した。この結果、まず腎臓にてd-リモネン投与群に明らかな分子量約16kDaの蛋白質のバンドの増強が認められウェスタンブロッティング法によりこの蛋白質は腎臓型の  $\alpha_{2u}$  - グロブリンであることがわかった。血清中の  $\alpha_{2u}$  - グロブリンはウェスタンブロッティング法によりのみ分子量約19kDa(通常型)の一に認められたが、d-リモネン投与群におおきな変動は見出せなかった。尿中の蛋白質をSDS-PAGEの後クマジーブリリアントブルーにより染色すると、d-リモネン投与群で明らかに分子量約16kDaの蛋白質の増加が認められた。この蛋白質はウェスタンブロッティング法により腎臓型の  $\alpha_{2u}$  - グロブリンと一致することが判明した。

フロントページの続き

(72)発明者 吉武 彬

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友化学工業株式会社内